

MMP-1 og MMP-3 som mulige kandidatgener ved cøliaki

Av stud.med. Ellen Kristine Stensby



Laboratoriearbeidet er utført ved Immunologiske institutt på Rikshospitalet i perioden: Juni-November 2000. Artikkelen er publisert i Scandinavian Journal of Gastroenterology, Volume 37, Number 8 (August 2002), page 931 – 935. Oppgaven er skrevet i perioden: Januar-April 2005

Introduksjon

Det er satt av 12 studieuker til den obligatoriske oppgaven på medisinstudiet. Jeg var med på et forskningsprosjekt på fulltid ved Immunologisk institutt på Rikshospitalet i perioden juni til november 2000, og det er forskningsresultatene fra dette prosjektet som danner grunnlaget for min oppgave.

Bakgrunnen for dette forskningsprosjektet er at cøliaki er en multifaktoriell sykdom med en stor genetisk komponent. Matrix metalloproteinase 1 (MMP-1) og MMP-3 bryter ned ekstracellulær matrix; økte nivåer er sett i cøliakilesjoner med vevsskade. Polymorfismer assosiert med økt ekspresjon (MMP-3 – 1171 allel 5A; MMP-1 – 1607 allel 2G), på 11q22.2, en region som tidligere har vist genetisk kobling til cøliaki, er assosiert med andre kronisk inflammatoriske sykdommer. Disse sykdommene kan dele en felles molekylær patologi med cøliaki. Dette var motivasjonen for å lete etter en assosiasjon mellom disse kandidatgenpolymorfismene og cøliaki.

Resultatene er publisert i *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, Volume 37, Number 8 (August 2002), page 931 – 935. Artikkelen følger oppgaven.

Bakgrunn

Historie

Et klinisk bilde av cøliaki ble første gang beskrevet så langt tilbake som 250 år før Kristus, av Aretaeus fra Kappadokia. Han beskrev i detalj en ikke tidligere kjent sykdom. Den beskrivelsen han ga av pasientene sine var ”koiliakios”, som betyr ”smerter fra tarmene”. Dr. Samuel Gee fikk i 1888 æren av å ha beskrevet sykdommen, med debut i barneår, kronisk diare og avmagring. Han beskrev forekomst blant både barn og voksne. Han foreslo også en form for behandling: ”Å regulere maten er den viktigste delen av behandlingen. Mel- og stivelseholdig mat tillates kun i små mengder, men hvis pasienten i det hele tatt kan bli kurert, må det være ved hjelp av en diett.”

Det behandlingsmessige gjennombruddet for cøliaki kom først i 1952 da nederlenderne Dicke og van de Kramer fant ut at sykdommen var et resultat av inntak av hveteproteiner, og som følge av dette foreslo de glutenfri diett som behandling. I 1954 ble denne behandlingen bekreftet som virksom av en forskergruppe i Birmingham, England, samtidig som den histologiske ødeleggelsen av tarmmukosa ble direkte relatert til cøliaki (1).

Cøliaki

Cøliaki er en multifaktoriell sykdom, der en kjenner til genetiske faktorer som disponerer for sykdommen, samtidig som man kjenner en miljøfaktor som utløser den. Man vet at HLA-gener og andre gener sammen med miljøfaktorer spiller en viktig rolle i utviklingen av sykdommen. Cøliaki, eller glutensensitiv enteropati, er en tilstand der gluten fra hvete og tilsvarende proteiner fra bygg og rug ikke tolereres (2). Blant de kroniske betennelsessykdommene står cøliaki i en særstilling, fordi man kjenner til den utløsende faktoren, altså gluten. Sykdommen forsvinner når gluten elimineres fra dietten. Det er dette som er grunnlaget for behandlingen av cøliaki (3). Forekomsten av cøliaki varierer veldig i ulike land. I den europeiske og den nord-amerikanske befolkningen er forekomsten rundt 1:150 (4).

Symptomer

Symptomene varierer veldig og er ofte uspesifikke, som trøtthet og slapphet. Vanlige symptomer fra GI-traktus er diaré eller steatorré, ubehag og smerter i magen og vekttap (5).

Cøliaki karakteriseres av en generell malabsorpsjonstilstand, og dette kan være første symptom, spesielt hos eldre barn, ungdom og voksne. Hos små barn er "failure to thrive" som er tilkommet etter innføring av grøt i kosten et vanlig symptom. Hos litt eldre barn kan dårlig vektøkning og lengdevekst vekke mistanke (6). Sår i munnslimhinnen og after forekommer hyppig, men oftest intermitterende. Nevrologiske symptomer som parestesier, muskelsvakhet og polyneuropati kan forekomme (5).

Diagnostikk

Diagnostiske kriterier i følge European Society for Pediatric Gastroenterology and Nutrition, ESPGAN (7):

- Kliniske funn forenlig med cøliaki.
- Påvisning av "flat" tynntarmsslimhinne ved tynntarmsbiopsi.
- Gliadinantistoffer og/eller endomysiumtest kan være positiv eller negativ.
- God og rask effekt av glutenfri kost, antistoffer forsvinner. Ny biopsi etter 1-2 år viser tilbakegang av slimhinneforandringene i tarmen.
- Provokasjonstest hvis pasienten ved diagnostiseringstidspunktet er under 2 år, i atypiske tilfeller og der det er tvil om diagnosen.

Disse kriteriene gjelder for barn, men er også rimelig å benytte ved diagnostisering av voksne.

Serologiske tester er viktige i diagnostikken av cøliaki. Det analyseres på antistoffer mot gluten eller mot subkomponenten gliadin (antigliadinantistoffer, AGA) og antistoffer mot endomysium eller vevstransglutaminase (TG2). Det er mest aktuelt å analysere på tarmens eget immunoglobulin, IgA. IgA mot gluten/gliadin er lite egnet til å stille cøliakidiagnosen. De fleste med aktiv cøliaki har forhøyede verdier, men verdier rundt og like over normalgrensen korrelerer dårlig med cøliaki (8).

Biopsi fra øvre del av tynntarmen vil vise et karakteristisk patologisk-anatomisk bilde med atrofi av tarmtottene og infiltrasjon av lymfocytter og plasmaceller (9). Endoskopøren bør ta minst tre biopsier, helst med stor tang, godt nede i duodenum. Det er grunn til å ta biopsier på vid indikasjon i enhver utredning av mageplager, ikke bare ved diaré. Endoskopøren bør se etter tegn som fravær av folder, furer og mosaikkmønster i slimhinnen (Bilde 1), selv om dette ikke er diagnostisk for cøliaki (8).



Bilde 1 Endoskopisk bilde fra duodenum ved total totteatrofi (8).

Det er viktig å stille en sikker diagnose før pasienten slutter å innta gluten, for senere blir det betydelig vanskeligere. Totteatrofien er reversibel, og etter en stund på glutenfri diett vil derfor tarmforandringene gå tilbake og tarmen får normalt utseende. Det er vanskelig å skille biopsier fra en behandlet cøliakitarm og fra en frisk tarm fra hverandre.

Patofysiologi

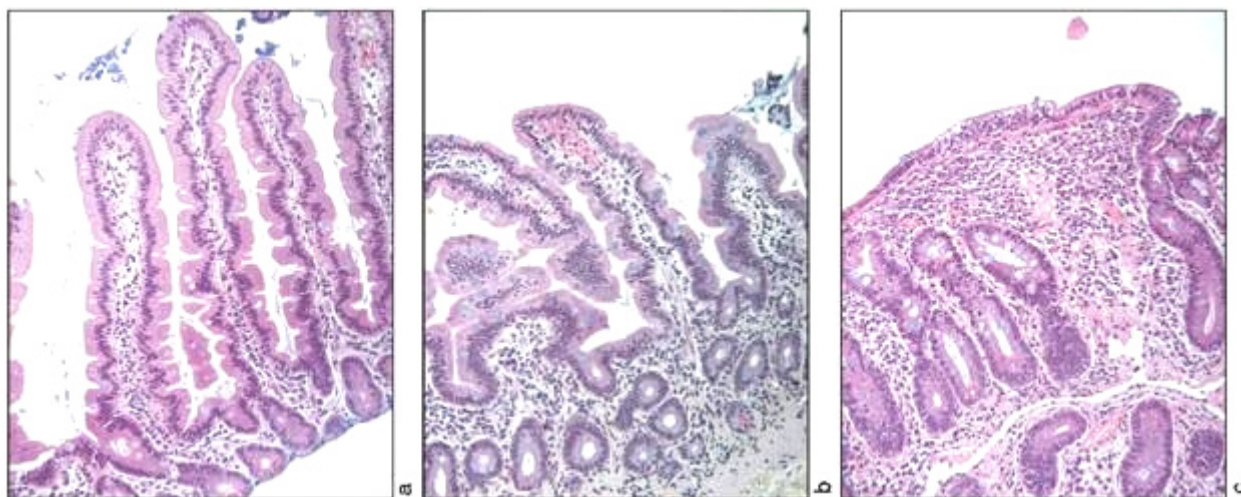
Skaden på tarmen ved cøliaki er karakterisert med skade på epitelcellene og betydelig økt antall T-lymfocytter i epitelet og i plasmacellene i lamina propria når tarmen blir eksponert for gluten (6;10). Akkumulasjon av lymfocytter forekommer også i mageslimhinnen og i kolon, men dette er mer sjeldent (10).

Histopatologi

Karakteristisk for cøliaki er (6):

- 1) Den flate mukosaen i tynntarmen, med korte, udefinerte eller helt manglende villi.
- 2) Ødelagte epitelceller på mukosaens overflate med mange intraepiteliale lymfocytter (T-celler).
- 3) Økt antall plasmaceller i lamina propria, men ikke i de dypere lagene.
- 4) Økt epitelial proliferasjon i kryptene.

De mest alvorlige histologiske forandringene ved ubehandlet cøliaki finner man vanligvis i duodenum og proksimale del av jejunum. Alvorligheten i forandringene avtar jo lenger distalt du kommer, og i noen tilfeller er mukosa tilsynelatende helt normal når man kommer til ileum. Man regner med at den kliniske alvorligheten av cøliaki er relatert til lengden av tarmen som er affisert (6).



Bilde 2 a) Velorientert tarmslimhinne med normale totter (Marsh 0). b) Relativt velorientert slimhinne med tydelig økt antall intraepiteliale lymfocytter (Marsh 1). c) Slimhinne med avflatet totterrelieff, økt antall intraepiteliale lymfocytter og betydelig antall plasmaceller i lamina propria (8).

Villi er korte og udefinerte eller helt fraværende, og kryptene er dypere enn normalt. Den totale tykkelsen på mukosa trenger ikke å være endret, fordi endringen i kryptenes dybde kompenserer for forkortningen av villi. Villøs atrofi, som er benyttet til å beskrive denne endringen, blir av mange regnet som en upresis beskrivelse, spesielt fordi hastigheten på epitelial fornyelse og migrasjon er inntil 6 ganger høyere ved cøliaki enn i en frisk tarm (6).

Mange pasienter har kun lette totteforandringer. Det er innført et relativt enkelt skåringssystem der tarmforandringene klassifiseres (8), (Tabell 1), (Bilde 2).

Absorpsjonscellene er flatere og mer basofile enn normalt og den basale polariteten i kjernene er borte. Elektronmikroskopisk undersøkelse avslører forkortning og fusjon av mikrovilli. Epitelcellene i Lieberkühns kryptene ser normale ut, men kryptene er dypere enn normalt og inneholder mange mitotiske cellekjerne. Antallet lymfocytter og plasmaceller i lamina propria er betydelig forhøyet. De fleste plasmacellene produserer IgA, som i en normal tynntarm. Polymorfe leukocytter og eosinofile celler kan også sees i økt antall i epitelet og i lamina propria (6).

Marsh-klasse	Histopatologi
Marsh 0	Normal
Marsh 1	Normal totte- og kryptestruktur, men økt antall lymfocytter (ofte T-cellerreseptor $\gamma/\delta+$) i epitelet
Marsh 2	Som 1 med krypthyperplasi
Marsh 3a	Som 2 med partiell totteatrofi
Marsh 3b	Som 2 med subtotal totteatrofi
Marsh 3c	Som 2 med total totteatrofi
Marsh 4	Atrofisk slimhinne (irreversibel)

Tabell 1 Marshs klassifikasjon av tynntarmsbiopsier (8).

Behandling

Livslang glutenfri kost vil i de aller fleste tilfeller tilhele tarmen, fjerne symptomene, oppheve mangeltilstandene og redusere risikoen for maligne sykdommer. Det er mulig at en konsekvent glutenfri kost beskytter mot utvikling av andre autoimmune sykdommer (11). Hva er så et glutenfritt kosthold? Rene råvarer fra melk, kjøtt, fisk, grønnsaker, poteter, frukt og bær er i utgangspunktet helt fri for gluten. Det er matvarer som inneholder korn som blir redusert i et glutenfritt kosthold. Varer av både hvete, rug og bygg er uønsket i kostholdet (11;12). Fagrådet i Norsk cøliakiforening har fra 2002 "tillatt" rentestet havre i kostholdet til voksne med cøliaki med følgende forbehold: Begynn forsiktig med små mengder (20 g per dag) i samsvar med lege og benytt kun spesialprodusert glutenfri havre. Anbefales ikke til personer under 18 år. Erfaringen er at de aller fleste voksne cøliakere tåler havre godt, men noen få reagerer (12;13).

I starten av kostbehandlingen kan noen pasienter ha nedsatt toleranse for fet mat, rå grønnsaker, frukt og bær. Mange pasienter med cøliaki har sekundær laktasemangel før de kommer igang med adekvat diett og bør derfor bruke laktoseredusert melk eller unngå melk og melkeprodukter inntil tarmtottene har vokst ut igjen og laktaseaktiviteten har økt tilstrekkelig (11).

Komplikasjoner

For alle rapporterte dødsårsaker er dødeligheten for pasienter med cøliaki fordoblet (oddsratio 2.0, 95% konfidensintervall 1.8-2.1) (14). Cøliakipasienter har ca 30% økt risiko for ondartet sykdom. Særlig kreft i mage-tarm-kanalen og lymfoproliferativ sykdom forekommer hyppigere, mens brystkreft og lungekreft forekommer signifikant sjeldnere blant pasienter med cøliaki, oddsratio er henholdsvis 0.35 (95% konfidensintervall 0.17-0.72) og 0.34 (95% konfidensintervall 0.13-0.95) (15). Overdødeligheten var imidlertid lavere hos pasienter med cøliaki som ikke samtidig hadde andre sykdommer. Overdødeligheten skyldes særlig sykdommer med immun dysfunksjon som fellesnevner, som lymfom, autoimmune sykdommer og infeksjoner (14).

Anemi er vanlig ved cøliaki og kan skyldes redusert absorpsjon av både jern, folsyre og vitamin B₁₂. Redusert absorpsjon av kalsium og D-vitamin kan gi hypokalsemi og krampeanfoll. Ved hypokalsemi blir kalsium mobilisert fra skjelettet og dette vil på lengre sikt gjøre bensubstansen skjor (9). Osteoporose er derfor vanlig hos cøliakere. Glutenfri diett bidrar til å gi bedret beintetthet. Osteopeni er vanlig hos pasienter som fikk cøliakidiagnosen som barn, men som har gått tilbake til normal kost (16).

Cøliaki gir økt risiko for malign tarmsykdom, spesielt non-Hodgkins lymfom (8) og T-celle lymfom i tynntarmen. Adenokarsinom i tynntarmen og plateepitelkarsinom i øsofagus forekommer også (6).

Det er sannsynlig at ubehandlet cøliaki gir økt risiko for andre autoimmune sykdommer, og at prevalensen av autoimmune sykdommer som opptrer samtidig med cøliaki er avhengig av lengden av gluteneksponering (17).

Dermatitis herpetiformis

Den sjeldne bulløse hudsykdommen dermatitis herpetiformis er assosiert med cøliaki (18). Den blir av noen også beskrevet som en type cøliaki, hudcøliaki (4). Sykdommen starter gradvis eller relativt raskt med en sterk kløende, sviende fornemmelse i huden. Det typiske utslettet, et polymorft utslett med små, grupperte papler eller vesikler, eventuelt bullae og

varierende grad av erytem, sitter på albuer, knær og nates (4;19). Diagnosen fastslås ved påvisning av granulære IgA-nedslag i dermale papiller ved immunofluoresensundersøkelse av hudbiopsi (19). Symptomer fra tarmen er ikke vanlig, men tynntarmsbiopsi fra disse pasientene vil i tilnærmet 100% av tilfellene være positiv, det vil si at man ser totteatrofi som ved cøliaki (4). Både enteropati og utslett vil gå tilbake ved bruk av glutenfri diett og kommer tilbake ved gjeninnføring av gluten i kosten (20). Det kan ta måneder før effekten av diett inntreffer, så i mange tilfeller vil det være aktuelt å supplere behandlingen med dapson (diaminodifenylsulfon) (19).

Genetikk

Et gen er en funksjonell enhet av DNA-molekylet. Det området på et kromosom som okkuperes av et gen kalles et locus. Alternative gener på et locus kalles alleler. Beskrivelsen av allelene på et locus kalles personens genotype for det aktuelle locus. Når man snakker om kandidatgener, menes gener som man helt eller delvis kjenner funksjonen til, og som man tror kan ha betydning for utviklingen av en bestemt sykdom. I et forskningsprosjekt som inkluderer gener bygger man gjerne opp en biologisk hypotese, og kandidatgener vil være naturlig å inkludere hvis man har en tankemodell for årsaker eller patogenese av en sykdom der genproduktet bidrar eller inngår som et avgjørende element (21).

Den store forekomsten av cøliaki blant førsteledds slektninger (10%) forteller at det er en stor genetisk komponent i utviklingen av cøliaki (2).

De fleste i Norge med cøliaki er bærere av HLA-haplotypen DR3-DQ2. DR3 og DQ2 er HLA (MHC)-klasse 2-molekyler. Disse molekylerne er heterodimerer av α - og β -kjeder som kodes av HLA-genkomplekset på kromosom 6. DQ2-molekylet på DR3-haplotypen kodes av alleler som heter DQA1*0501 og DQB1*0201. De samme allelene gjenfinnes hos en annen gruppe cøliakipasienter, mannlige bærere av haplotypene DR5-DQ7 og DR7-DQ2 (dvs de som er DR5/DQ7-heterozygote) (3).

Ca 25% av den norske befolkningen har HLA-DQ2 (DQA1*05/DQB1*02), men bare et fåtall av disse utvikler cøliaki. Dette viser at det er andre faktorer enn HLA-gener som er viktige for sykdomsutviklingen (3). Likevel er 95% av pasienter med cøliaki DQ2 (DQA1*0502/DQB1*0201) positive (22).

HLA kan være ansvarlig for mindre enn 40% av familiær opphopning av cøliaki (23;24). Gener som ikke tilhører HLA-familien må derfor også være involvert ved cøliaki, og er kanskje viktigere enn faktorer i HLA-komplekset.

Cøliaki er dobbelt så vanlig hos kvinner som hos menn. I andre polygene inflammatoriske sykdommer har koblingsstudier avslørt klare kjønns spesifikke forskjeller (25). Ved cøliaki er det funnet en mulig kobling til kromosom 2q33, 5q og 11q hos familier hvor minst en mann var syk, men den samme koblingen er ikke funnet for affiserte kvinner i en familie (26).

Mekanismen for avflatning av mukosa og bortfall av villi som sees hos cøliakipasienter er fortsatt ukjent. Det er riktignok stilt spørsmål ved rollen til proteaser som degraderer ekstracellulær matrix (27). Matrix metalloproteinase 3 (MMP-3) og MMP-1 ekspresjonen er signifikant forhøyet i en ubehandlet cøliakipasients tarm, sammenlignet med biopsier tatt fra friske personer (28). MMP-3 promotoren kan inneholde enten fem eller seks adenosiner i posisjon 1171 (5A allel) eller 6A allel (29). MMP-1 angriper fibrillær kollagen, inkludert type I og type III, som dominerer i tarmen. MMP-1 promotor dimorfismen i posisjon 1607 har

enten en eller to guanin (1G eller 2G alleler). Allel 2G er assosiert med høyere konsentrasjon av cellulær MMP-1 mRNA enn allel 1G er (30). MMP-1 er lokalisert på 11q22-23 og MMP-3 på 11q22.3, som er regnet for å være en høy-risiko region.

På grunn av det overnevnte, er MMP-1 og MMP-3 interessante kandidatgener. I vår studie testet vi et stort antall familier og kontroller for å lete etter en assosiasjon med cøliaki.

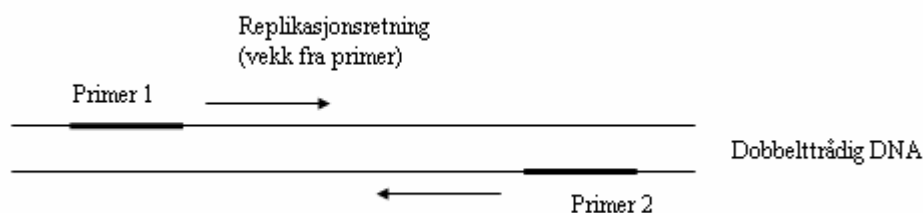
Materiale

Vi utførte arbeidet vårt i en to-trinnsmetode. Vi typet først 225 norske og svenske familier (datasett 1). For å kontrollere funnene våre brukte vi en uavhengig samling av 102 norske og svenske familier (datasett 2). Videre benyttet vi 160 uavhengige kontroller fra Det Norske Beinmargsregistert. Hver familie ble analysert som en trio: Den syke (ved flere syke søsken i en familie, ble den som først fikk diagnosen benyttet), mor og far. Vi benyttet TDT (transmission/disequilibrium test) (31) da vi lette etter skjevheter i transmisjonen av MMP-1 og MMP-3 alleler fra heterozygote foreldre til deres syke barn. Vi utførte testingen for MMP-1 og MMP-3 hver for seg.

Metode

Polymerase Chain Reaction, PCR

Polymerase Chain Reaction, PCR, har blitt et viktig forskningsverktøy siden den ble oppdaget i 1985 (32). PCR etterligner naturens egen måte å replikere DNA på. Mer presist blir et segment av DNA som er lokalisert mellom to definerte primere amplifisert (Figur 1).



Figur 1 Target DNA, det som er mellom Primer 1 og Primer 2, blir kopiert i PCR-reaksjonen (32).

PCR starter med en DNA-prøve som blandes i et reaksjonrør sammen med primere (korte syntetiske deler av enkelttrådig DNA, som er komplementære til den delen av DNA som man ønsker å amplifisere), deoxynukleotidtrifosfat (dNTP, byggesteinene i DNA), buffer og varmeresistent polymerase (et enzym som kopierer eller replikerer DNA) (32;33).

Primerne kan enten være spesifikke for en spesiell DNA-nukleotidesequens, eller de kan være ”universelle”. Universelle primere er komplementære til nukleotidesequenser som er vanlige i det aktuelle DNA-molekylet. De kan derfor binde seg til en stor mengde ulike templatere og kan derfor ikke benyttes for å finne en spesiell nukleotidesequens (33).

Primerne jeg benyttet var spesifikke, og forward primerne var fargemerket:

mmp1.p.fwd: 5'-TGC-CAC-TTA-GAT-GAG-GAA-ATT-G-3'
mmp1.p.rev: 5'-TCC-TCC-CCT-TAT-GGA-TTC-CT-3'
mmp3.p.fwd: 5'-AAT-TCA-CAT-CAC-TGC-CAC-CA-3'
mmp3.p.rev: 5'-GCC-TCA-ACC-TCT-CAA-AGT-GC-3'

Jeg brukte mye av tiden jeg forsket til å optimalisere PCR-oppskriften for de overnevnte primerne. Det var vanskelig å optimalisere PCR-reaksjonen og dermed få gode PCR-produkter. De så etter mye prøving og feiling bra ut ved gelelektroforese, men de var ikke spesifikke nok da produktene ble kjørt på ABI 377XL Sequencer. De PCR-oppskriftene jeg tilslutt benyttet, er beskrevet i Tabell 2 og Tabell 3.

dH ₂ O	759 µl
Buffer x10 *	100 µl
dNTP (20mM)	10 µl
MgCl ₂ (25mM)	81 µl
Primer fwd (20pmol/µl)	10 µl
Primer rev (20pmol/µl)	10 µl
Taq polymerase (5U/µl)	5 µl
Totalt volum	975 µl

Tabell 2 PCR-oppskrift MMP-3 fwd/rev. 96 prøver.
Benytter 10µl av mixen + 3µl DNA (20 ng/ µl) i hver brønn på PCR-brettet. * Fra Promega: 10mM Tris-HCl, 50mM KCL, 0.1% TritonX-100

dH ₂ O	740 µl
Buffer x10 *	100 µl
dNTP (20mM)	10 µl
MgCl ₂ (25mM)	100 µl
Primer fwd (20pmol/µl)	10 µl
Primer rev (20pmol/ µl)	10 µl
Taq polymerase (5U/ µl)	5 µl
Totalt volum	975 µl

Tabell 3 PCR-oppskrift MMP-1 fwd/rev. 96 prøver.
Benytter 10µl av mixen + 3µl DNA (20 ng/ µl) i hver brønn på PCR-brettet. * Fra Promega: 10mM Tris-HCl, 50mM KCL, 0.1% TritonX-100

Det er tre hovedsteg i PCR som repeteres i 30-40 sykluser. Dette gjøres i en automatisert maskin, PCR-maskinen (PE Biosystems 9700), som kan varme opp og kjøle ned rørene der reaksjonen skal skje til nøyaktige temperaturer på veldig kort tid (32;34;35), (Figur 2).

1) Denaturering ved 92°C – 96°C

Hydrogenbindingene som holder de to DNA-trådene sammen blir brutt ved 92°C-96°C. Dette kalles denaturering av DNA og man sitter igjen med enkelttrådig DNA. Under denatureringen er det ingen enzymaktivitet, da enzymene ikke virker ved så høy temperatur. Tiden som er nødvendig for denaturering avhenger av kompleksiteten til templatet, formen og volumet på reaksjonsrøret, og PCR-maskinen. Mellom ti og seksti sekunder er normal denatureringstid.

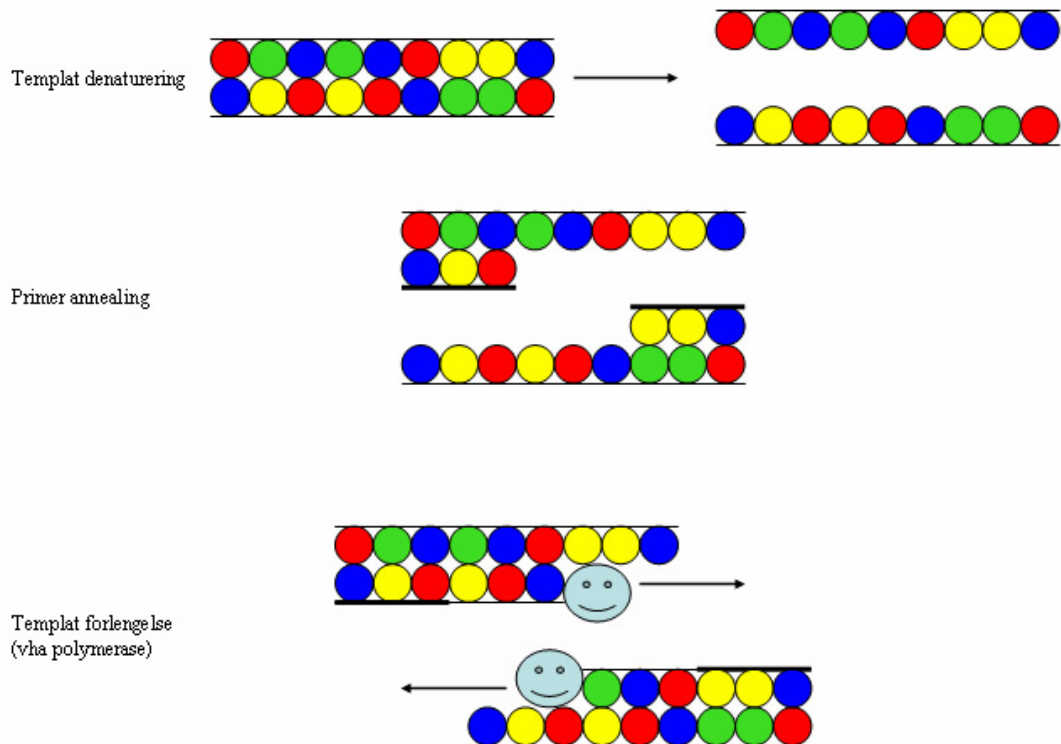
2) Langsom avkjøling (annealing) til 37°C – 65°C

Når blandingen er kjølt ned til 37°C-65°C binder de syntetiske oligonukleotidprimerne seg til hver sin komplementære, enkelttrådig DNA-sekvens, i ytterendene på det fragmentet som skal kopieres. Når noen baser er kopiert, blir bindingene mellom de to trådene så stabile at de holdes sammen og danner en ny dobbeltrådig DNA-sekvens. Temperaturen som er nødvendig i dette stadiet avhenger av primernes homologi til målsekvensen og av basenes sammensetning i primersekvensen. Mengden av Mg²⁺ er

viktig på dette tidspunktet av reaksjonen, og betyr mye for hvor spesifikt det syntetiserte produktet blir.

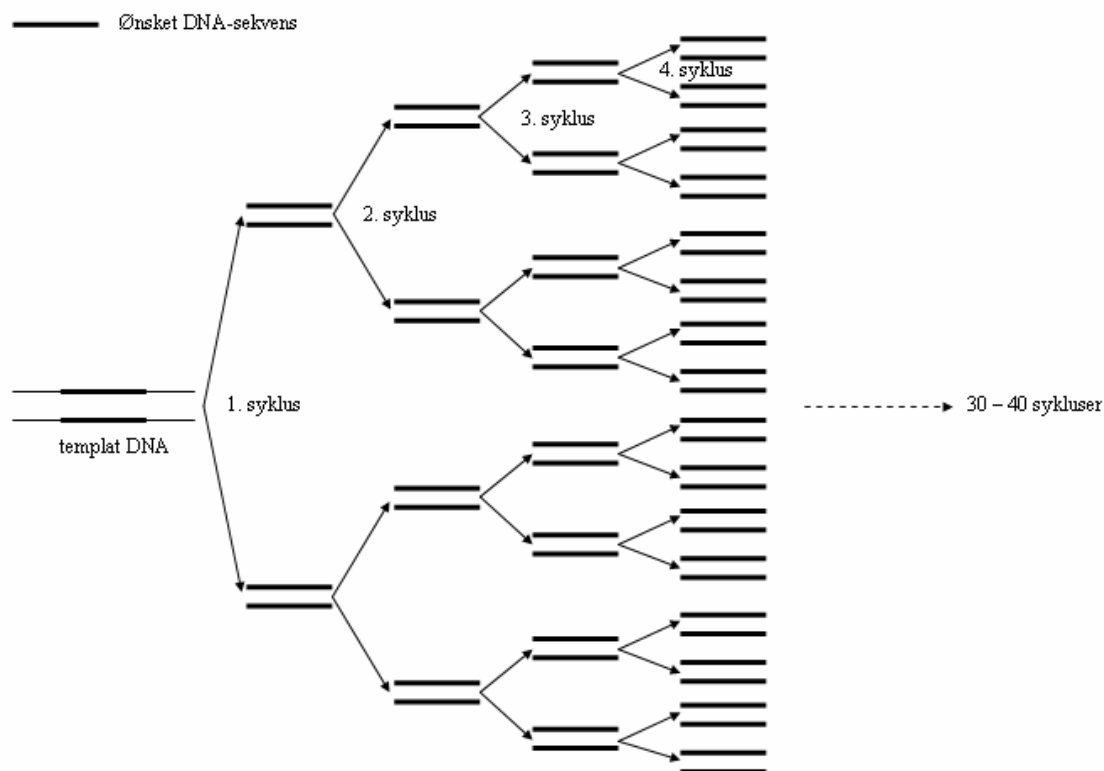
3) Ekstensjon ved 72°C

Den bundne oligonukleotideprimeren blir ekstendert i 5' → 3' retning vha DNA-polymerase, og det originale DNA'et benyttes som templat. Denne reaksjonen skjer ved 72°C, som er den ideelle arbeidstemperaturen for polymerasen. Tiden som trengs for å oppnå full ekstensjon avhenger av produktets lengde og enzymaktiviteten.



Figur 2 En syklus i en polymerase chain reaction, PCR (32).

Fordi begge DNA-trådene blir kopiert i løpet av en PCR-syklus, er det en eksponensiell vekst i antall kopier av genet. Hvis man tenker seg at det kun er en kopi av det ønskede genet før syklusene starter, vil det etter en syklus være to kopier av genet, etter to sykluser fire kopier og etter tre sykluser åtte kopier osv (34) , (Figur 3).



Figur 3 Den eksponensielle amplifikasjonen av et gen i en PCR-reaksjon (34).

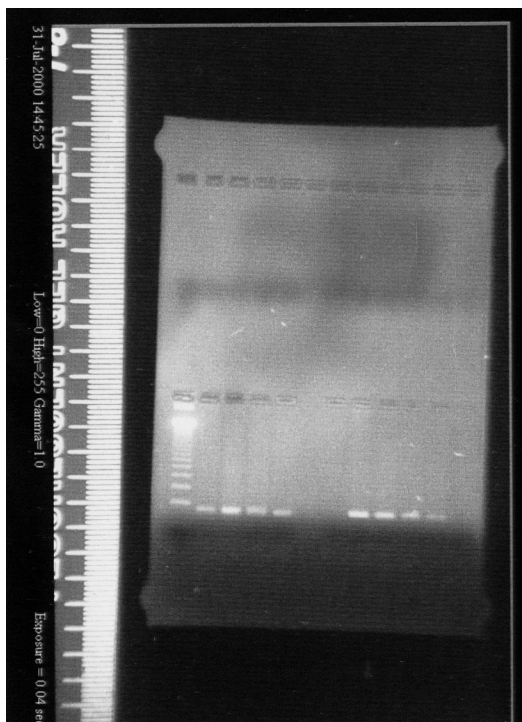
Elektroforese

Før PCR-produktet som er dannet kan benyttes til videre applikasjoner, er det viktig å sjekke følgende (34):

- 1) Er det dannet et produkt?
Siden det kreves nøyaktighet, er det ikke alle PCR som blir vellykket. Mulige årsaker kan være at kvaliteten på DNA'et er dårlig, at en av primerne ikke passer eller at det er for mye templat i utgangspunktet.
- 2) Har produktet riktig størrelse?
Det er mulig at det er dannet et produkt, f.eks. et bånd med 500 baser, mens det forventede genproduktet skulle ha vært 1800 baser langt. Mulige årsaker kan være at en av primerne også passer på en del av genet som sitter nærmere den andre primeren, eller at begge primerne passer på flere steder i genet.
- 3) Er det bare ett bånd som er dannet?
Som beskrevet under punkt 2, er det mulig at primerne passer på flere steder, og kan derfor danne produkter med ulik lengde. I dette tilfellet kan man få flere bånd i samme kolonne på en gel.

De overstående spørsmålene får man enkelt svar på ved å kjøre en gelelektroforese (Bilde 3). DNA er et negativt ladet molekyl og vil derfor vandre mot en positiv pol (anode) når det avsettes på en gel som så tilføres strøm (elektroforese). Små fragmenter av DNA vandrer hurtigere gjennom gelen enn store fragmenter gjør. Gelen består av agarose og TAE-buffer som er tilsatt etidiumbromid. Gelen legges i et elektroforesekommer og dekkes helt med buffer før PCR-produkter tilsatt 5x TAE loading buffer appliseres i brønnene og strømmen settes på. Loading bufferen er farget, for eksempel lilla. Fargen gjør at PCR-

produktene visualiseres lettere. Loading bufferen er laget tyngre enn TAE-bufferen, slik at PCR-produktene holder seg nede i gelen og ikke flyter opp og blander seg med bufferen. Man kan variere strømstyrken avhengig av størrelsen (lengden) på gelen/apparatet. Spenningen bør økes med 5-10 Volt per cm mellom elektrodene.



Bilde 3 Bilde av en ferdigkjørt gel. Til venstre på gelen vises stigen (123bp DNA ladder), og genproduktene har riktig størrelse, men det mangler genprodukt i to av de midterste kolonnene (brønnene).

ABI 377XL Sequencer

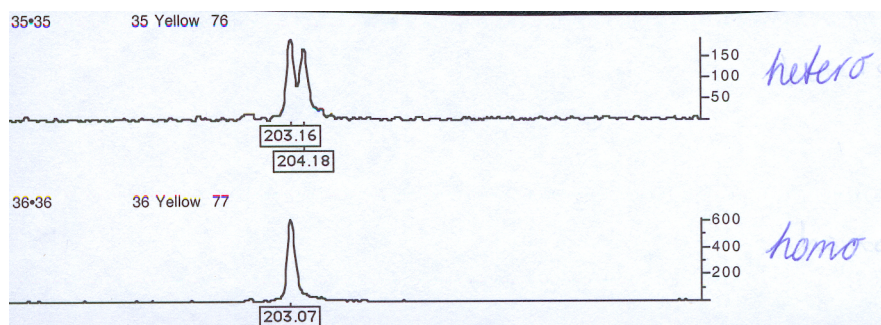
ABI PRISM® 377 DNA Sequencer gjør en automatisk separering av DNA-molekyler som er merket med forskjellige fluoreserende fargestoffer som kalles kromoforer (36). Den automatiserte sekvensatoren bruker laserlys til å kjemisk stimulere kromoforene, som deretter sender ut lys med en annen bestemt bølglengde. Sekvensatoren kan på denne måten gjenkjenne de fluoresens merkede DNA fragmentene. De fluoreserende fargene kan enten være bundet til dideoksynukleotider (ddNTP) som fungerer som avslutning på kjeden, noe som brukes ved sekvensering, eller de kan være bundet til den ene PCR-primeren slik at den totale lengden på PCR-produktet detekteres, noe som gjøres ved såkalt fragmentlengde-analyse. Det sistnevnte ble benyttet i denne studien. Et lite volum fluoresens-merket PCR-produkt blir tilsatt loading buffer og en fragmentlengde standard (GENESCAN 500) og denaturert ved 95°C i to minutter før det plasseres på is inntil det blir avsatt i hver sin brønn på en 0.2mm tykk vertikal polyakrylamidureagel, som støpes mellom to glassplater (32). Bufferkamrene på toppen og bunnen av gelen fylles med 1xTBE buffer (triborat-EDTA buffer), slik at strømmen på 10 000 volt kan ledes gjennom gelen. Gelen holder en konstant temperatur på 51°C gjennom hele elektroforesen (32), for å opprettholde denaturerende betingelser slik at PCR-produktene forblir enkelttrådige.

Separasjonen som skjer ved elektroforesen kan til enhver tid følges på en dataskjerm og sluttdataene analyseres ved hjelp av programvaren GeneScan hvor fragmentene blir representert i et grafisk display under kjøringen. Akkurat som ved agarosegelelektroforesen beskrevet ovenfor, vil korte fragmenter ha vandret gjennom gelen raskest. Dette vil man kunne se fra resultatene presentert i GeneScan (36). Etter analyse av rådataene med

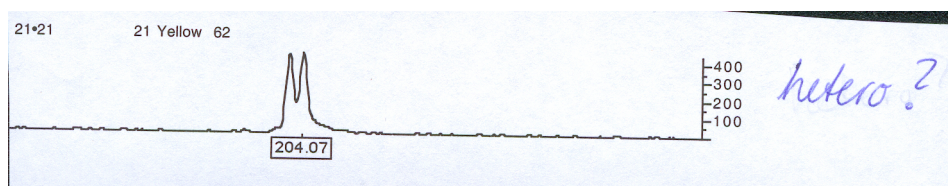
GeneScan, benyttet vi programvaren Genotyper (Applied Biosystems) for å lese fluoresenstoppene for hver farge, og bestemme fragmentlengden i forhold til fragmentstigen beskrevet ovenfor (Genescan 500).

Det er mulig å støpe geler av forskjellige lengder for å oppnå ulik oppløselighet i analysen (36). Vanligvis benyttes geler som er 12 cm lange for fragmentanalyse, da dette tillater raske kjøring. PCR-produktene i denne studie ble separert på en ABI 377XL Sequencer (Applied Biosystems) på 36 cm geler. Grunnen til at denne gel-lengden ble valgt var for å kunne skille mellom PCR-fragmenter med bare et basepar forskjell i lengden. Forholdene ble også modifisert for å få en enda bedre oppløsning da det bare var en base forskjell i lengden på fragmentene. Vi tilnærmet halverte elektroforesestrømmen i forhold til hva produsenten normalt anbefaler, til 1680V. To kontrollprøver med kjent lengde ble kjørt på hver gel for å hindre gel til gel forskjeller.

MMP-3 kjøringene på sekvensatoren gikk stort sett bra (Figur 4). Et fåtall prøver var vi i tvil om hvordan skulle tolkes (Figur 5). På disse prøvene kjørte vi en ny PCR, med samme oppskrift og en ny gel. Alle prøvene ga da tolkbare resultater.



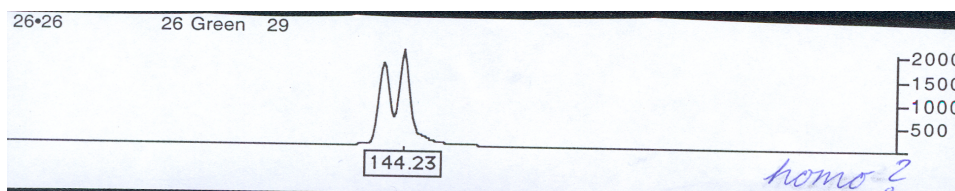
Figur 4 Tolkning av fragmentlengder for MMP-3. Den øverste viser en heterozygot (den andre toppen skal være lavere enn den første) og den nederste en homozygot.



Figur 5 Tolkning av fragmentlengder for MMP-3. Denne har to topper som er omtrent like høye, og var derfor vanskelig å tolke. Er denne hetero- eller homozygot? Prøven ble repetert og personen viste seg å være heterozygot.

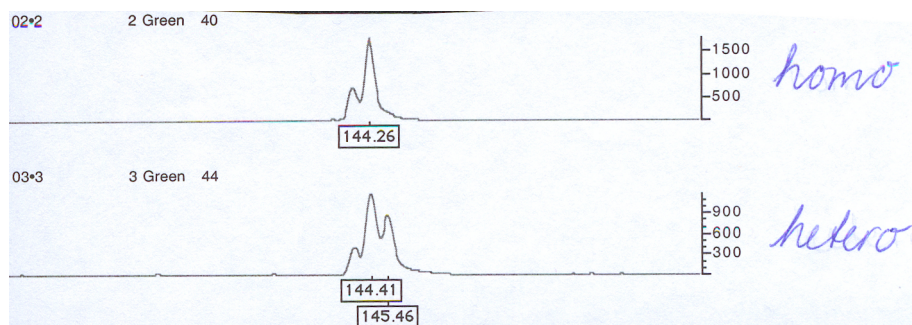
Det var spesielt MMP-1 som skapte problemer. Jeg fikk veldig uregelmessige toppe etter gelanalysen. I et forsøk på å forbedre PCR-produktene slik at amplifiseringen ble jevnere byttet jeg ut halvparten av Taq-polymerasen med Pfu-polymerase. Pfu-polymerase har 3'- til 5'- eks nukleaseaktivitet, som gjør det mulig å korrigere eventuelle feil i nukleotidinnsettingen. Dette ga sterke resultater ved ABI-sekvensering, men resultatene virket ikke troverdige da ingen av prøvene var homozygote, og det kunne ikke være tilfelle (Figur 6). Etter å ha diskutert dette med flere på laboratoriet som ikke hadde sett noe lignende tidligere, tok jeg kontakt med Applied Biosystems Support i Sverige. Svaret herfra var at de også undret seg over problemene, men anbefalte å kutte ut Pfu, og heller la Taq-polymerasen få gjøre sine feil. De anbefalte at man mot slutten av PCR-reaksjonen skulle legge til 30

minutter med 60°C. Grunnen til dette er at Taq polymerasen under PCR-reaksjonen ofte setter på en ekstra A noe som medfører at man for hvert PCR-produkt både får fragmenter av rett lengde, samt fragmenter med en ekstra base. Når man skal skille PCR-produkter med bare et basepar forskjell, vil dette interferere og forstyrre tolkningen. Ved å la PCR-reaksjonen holdes ved 60 °C i 30 minutter etter at amplifisering er ferdig, blir denne påsettingen av A-overheng mer komplett slik at det blir en dominant topp for hvert PCR-produkt.



Figur 6 Tolkning av fragmentlengder for **MMP-1**. Her illustreres problemet som er beskrevet i teksten. Denne prøven har to topper, der den første er lavere enn den andre. Legg også merke til den sterke fluoresensintensiteten. Er denne hetero- eller homozygot? Prøven ble repetert etter at Pfu hadde blitt byttet tilbake til Taq og det ble lagt til 30 minutter med 60°C. Personen viste seg da å være homozygot.

Vi kjørte ny PCR på alle prøvene med primere for MMP-1, slik vi ble anbefalt å gjøre av Applied Biosystems Support. Dette ga resultater som samsvarte med det vi forventet (Figur 7). All tvil ble fjernet fra tolkningen av resultatene fra kjøringer utført på denne måten, slik man kan se ved å sammenligne de nevnte figurene.



Figur 7 ABI tolkning av **MMP-1**. Den øverste viser en homozygot og den nederste en heterozygot. Her vises polyadenosinhale som en ekstra topp før de to reelle toppene.

Siden vi brukte familier i denne studien, kunne vi se på genotypene i familien for å kontrollere at resultatene våre stemte. Det var to familier der barnet ikke kunne være farens biologiske, dette ble verifisert med genotyping av familiene i forbindelse med en annen studie. Disse to familiene ble derfor fjernet fra studien.

Transmission/disequilibrium test, TDT

Vi gjorde TDT ved hjelp av TDTPHASE programmet (37). Vi testet først datasett 1 og datasett 2 hver for seg. For å kartlegge om det fantes kjønnsspesifikke assosiasjoner, kombinerte vi deretter datasett 1 og datasett 2 som så ble inndelt etter den sykes kjønn og testet med TDT. Transmisjonsfrekvensen i datasettet ble testet mot den forventede transmisjonsfrekvensen som er 50 gitt at det ikke er noen assosiasjon mellom cøliaki og den genetiske varianten som undersøkes. Konfidensintervallet (CI) for transmisjonsfrekvensen (%T) av allelene ble beregnet etter følgende formel:

$$95\% \text{ CI} = \%T \pm 1.96 \sqrt{[p(1-p)/n]}$$

hvor p er antall transmisjoner av et bestemt allel og n er det totale antallet mulige transmisjoner av dette allelet. En korrigert P -verdi (P_c) på 0.05 eller mindre, ble regnet som signifikant. P -verdien ble regnet ut ved hjelp av McNemar χ^2 -metode (38). Koblingsulikevekten mellom tilstøtende markører for MMP-1 og MMP-3 ble regnet ut og kombinert i familiesamlingene (datasett 1 + datasett 2) (29).

Resultater

TDT for MMP-1 allel 2G viste ingen signifikant assosiasjon i datasett 1 (136 (36%) transmisjon (T), P = ikke signifikant). Heller ikke separat test av datasett 2 viste signifikant assosiasjon (T = 63 (49%), P = ikke signifikant). På samme måte viste MMP-3 allel 5A ingen assosiasjon med cøliaki i datasett 1 (T = 125 (49%), P = ikke signifikant), og heller ikke i datasett 2 (T = 54 (50%), P = ikke signifikant). Vi kombinerte så dataene fra de to samlingene for å øke antallet i testen. Dette førte til at vi hadde et stort antall prøver til TDT, inndelt etter pasientenes kjønn (kun en tredjedel av pasientene var hankjønn). Resultatene er gitt i Tabell 4 (29).

Etter kjønnsinndelingen var ingen av allelene signifikant assosierte, selv om MMP-3 allel 5A viste en beskyttende tendens hos hankjønn (T = 45 (40%), P_c = 0.2). Fraværet av signifikans kan gjenspeile mangel på "power" i testen. For å bekrefte denne tendensen typet vi uavhengige kontroller og regnet ut oddsratio for denne delen i en kasus-kontroll setting. Kasusene er ikke uavhengige i forhold til dem som ble brukt i den opprinnelige TDT-analysen, selv om mange av dem er andre personer (syke søsken). Denne testen ble likevel brukt til å trekke ut videre informasjon av det store familiematerialet (29).

Markør, allel	Kjønn	T*	NT†	%T‡	95% KI	χ^2	P §	P_c
MMP-1 (2G)	♂ + ♀	199	187	51.6%	46.6% - 56.5%	0.37	ns	ns
MMP-1 (2G)	♂	65	63	50.8%	42.1% - 59.4%	0.03	ns	ns
MMP-1 (2G)	♀	134	124	51.9%	48.8% - 58.0%	0.39	ns	ns
MMP-3 (5A)	♂ + ♀	179	181	49.7%	44.6% - 54.9%	0.01	ns	ns
MMP-3 (5A)	♂	45	67	40.2%	31.1% - 49.3%	4.32	0.04	ns
MMP-3 (5A)	♀	134	114	54.0%	47.8% - 60.2%	1.61	ns	ns

Tabell 4 Analyse av kombinasjonen av data 1 og data 2, i tillegg inndelt for kjønn. Bare MMP-3 allel 5A (uthevet) viste en tendens til assosiasjon i dette materialet, men assosiasjonen var ikke signifikant (29).

* Transmittert; † Ikke-transmittert; ‡ Prosent transmittert; § P -verdi; || P -verdi korrigert for antall tester (seks); ns = ikke signifikant

Vi var ikke i stand til å reproducere den antydende assosiasjonen for MMP-3 allel 5A blant hankjønn med en statistisk signifikans: 102 alleler hos hankjønn-kasus (44% av totalt 230 alleler) var 5A, mens 66 alleler hos hankjønn-kontroller (54% av totalt 122 alleler) gir en oddsratio på 0.68 (95% konfidensintervall: 0.42-1.08), P = 0.08. "Power" i denne testen er retrospektivt utregnet til å være 81%. Ut fra 95% konfidensintervallet kan vi ikke utelukke at det finnes en assosiasjon, men vi kan heller ikke si at det er en i den gruppen vi testet (29).

Genotypefrekvensen hos de beskrevne kasus- og kontrollgruppene for henholdsvis MMP-1 og MMP-3 er gitt i Tabell 5. Under transmisjonen observerte vi konsekvent følgende: For personer som er homozygote for MMP-3 allel 5A, er oddsratioen 0.45 (95% konfidensintervall 0.20-1.04), P = 0.04. Dette er i grenseområdet for signifikans, men konfidensintervallets spennvidde inkluderer 1.0 (ingen effekt). Pasienter som er homozygote for MMP-1 allel 2G, har en oddsratio på 1.75 (95% konfidensintervall: 0.69-4.82), P = 0.2 (29).

MMP-1 Genotype	♂ Kasus (%) n = 115	♂ Kontroller (%) n = 61
1G-1G	27 (23%)	19 (31%)
1G-2G	64 (56%)	34 (56%)
2G-2G	24 (21%)	8 (13%)

MMP-3 Genotype	♂ Kasus (%) n = 115	♂ Kontroller (%) n = 61
5A-5A	17 (15%)	17 (28%)
5A-6A	68 (59%)	32 (52%)
6A-6A	30 (26%)	12 (20%)

Tabell 5 Genotypefrekvensen for **MMP-1** (venstre side) og **MMP-3** (høyre side) for kasus og kontroller (29).

Alleler av en genetisk markør kan være assosiert med spesifikke alleler i et annet locus på samme kromosom. Slik assosiasjon mellom alleler i ulike loci kalles koblingsulikevekt (linkage disequilibrium). Loci som er koblet vil ofte være i koblingsulikevekt. Det betyr at et allel på et locus oftere (eller sjeldnere) forekommer sammen med et visst allel på et annet locus enn forventet fra produktet av allelfrekvensene (kalles ofte allelisk assosiasjon). Flere faktorer påvirker graden av koblingsulikevekt, men koblingsulikevekt forekommer ofte mellom alleler i loci som ligger nær hverandre på kromosomet. Jo nærmere på kromosomet, jo sjeldnere rekombinasjon mellom de to loci, jo større mulighet for koblingsulikevekt. Et godt eksempel på koblingsulikevekt finnes mellom de ulike loci i HLA-systemet. Denne ulikevekten er nødvendig å kjenne til for å fortolke assosiasjoner mellom HLA-varianter og sykdom (21).

Siden MMP-1 og MMP-3 bare ligger 19,1 kbp fra hverandre, testet vi koblingsulikevekten mellom disse markørene (MMP-1 allel 5A/MMP-3 allel 2G) for å finne ut hvorvidt det var en risiko for modifisering av haplotypen. Vi fant at disse allelene sjelden er funnet sammen ($D' = -0.5$, $\chi^2 = 87.9$). Haplotype-analyse var derfor av begrenset interesse. Selv om det er sjeldent, kan denne haplotypen gi en effekt, så vi testet likevel transmisjonen av haplotypeforekomsten for begge MMP'ene, og fant ingen assosiasjon (58 transmitterte haplotyper, mot 59 ikke-transmitterte, $P = 0.9$) (29).

Konklusjon

Det er fornuftig å anta at MMP-1 og MMP-3 er involvert i patogenesen av cøliaki. Men hvorvidt økt aktivitet i cøliakipasienters tarm er et direkte resultat av genetiske variasjoner med uttrykksmodifiserende effekter eller om MMP-aktiviteten ved cøliaki er initiert og opprettholdt av irregulære cytokinprossesser, forblir uklart. Funksjonelle promotorpolymorfismer av MMP-1 og MMP-3 er funnet å kunne relateres til andre immunmedierte tilstander, men vi fant ingen sterke bevis for en assosiasjon med cøliaki. Funnene for MMP-3 allel 5A bør testes for assosiasjon hos hankjønn med cøliaki i andre uavhengige og større befolkningsgrupper. Med utgangspunkt i hypotesen beskrevet i introduksjonen er disse funnene viktige for vår forståelse av genetikken ved cøliaki. Arbeidet med å identifisere gener som predisponerer for cøliaki på kromosom 11q bør fortsette (29).

Takk til

Jeg ønsker å takke Immunologisk institutt, Rikshospitalet og CD-gruppa, spesielt Ludvig M. Sollid som lot meg være med i sin gruppe og som har vært veilederen min. Det har vært veldig motiverende og lærerikt. En stor takk går også til Andrew S. Louka for god hjelp og veiledning underveis. Takk til Bente Talseth, Benedicte A. Lie og Øyvind Molberg for hjelp og motivasjon hver gang det dukket opp et problem.

Reference List

- (1) History of CD. 2005. <http://www.csaceliacs.org/HistoryofCD.php>. Celiac Sprue Association.
- (2) Sollid LM. Molecular basis of celiac disease. *Annu Rev Immunol* 2000;18:53-81.
- (3) Sollid LM, Lundin KE. [Disease mechanisms in coeliac disease]. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2003 Nov 20;123(22):3230-3.
- (4) Fasano A, Catassi C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology* 2001 Feb;120(3):636-51.
- (5) Kumar PJ, Clark ML. Gastroenterology. In: Kumar P, Clarke M, editors. *Clinical medicine*. 2001. p. 254-6.
- (6) Hamilton SR, Farber JL, Rubin E. The Gastrointestinal Tract. In: Rubin E, Farber JL, editors. *Pathology*. 3. ed. 1999. p. 668-755.
- (7) Walker-Smith JA, Sandhu BK, Isolauri E, Banchini G, van Caillie-Bertrand M, Dias JA, et al. Guidelines prepared by the ESPGAN Working Group on Acute Diarrhoea. Recommendations for feeding in childhood gastroenteritis. *European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997 May;24(5):619-20.
- (8) Lundin KE, Farstad IN, Sollid LM. [Coeliac disease--new clinical findings and diagnostic tools]. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2003 Nov 20;123(22):3226-9.
- (9) Jacobsen D, Kjeldsen SE, Ingvaldsen B, Lund K, Solheim K. Sykdommer i mage-tarm-kanalen. *Sykdomslære - Indremedisin, kirurgi og anestesi*. 1 ed. 2001. p. 229-71.
- (10) Crawford JM. The Oral Cavity And Gastrointestinal Tract. In: Kumar V, Cotran RS, Robbins SL, editors. *Basic Pathology*. 6th ed. 1997. p. 470-515.
- (11) Lovik A, Lundin KE. [Dietary treatment of coeliac disease and dermatitis herpetiformis]. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2003 Nov 20;123(22):3237-40.
- (12) Norsk cøliakiforening. 26-11-2004. www.ncf.no, Norsk cøliakiforening.
- (13) Kronholm K. [Adults with celiac disease can eat pure oat]. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2001 Jan 30;121(3):364.
- (14) Hem E. Økt dødelighet ved cøliaki. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2003;20:2839.
- (15) Hem E. Økt dødelighet ved cøliaki. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2004;23:3024.
- (16) Cellier C, Flobert C, Cormier C, Roux C, Schmitz J. Severe osteopenia in symptom-free adults with a childhood diagnosis of coeliac disease. *Lancet* 2000 Mar 4;355(9206):806.
- (17) Ventura A, Magazzu G, Greco L. Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. *SIGEP Study Group for*

Autoimmune Disorders in Celiac Disease. *Gastroenterology* 1999 Aug;117(2):297-303.

- (18) Reaktive erytematøse sygdomme. In: Andersen KE, From E, Thestrup-Pedersen K, Wulf HC, editors. *Klinisk dermatologi og venerologi*. 2001. p. 81-114.
- (19) Gjersvik PJ, Ronnevig JR. [Dermatitis herpetiformis]. *Tidsskr Nor Lægeforen* 2003 Nov 20;123(22):3234-6.
- (20) Reunala T, Collin P. Diseases associated with dermatitis herpetiformis. *Br J Dermatol* 1997 Mar;136(3):315-8.
- (21) Magnus P, Lie R. En oversikt over design i klassisk genetisk epidemiologi. *Norsk epidemiologi* 2002;12(2):103-8.
- (22) Sollid LM, Thorsby E. HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterology* 1993 Sep;105(3):910-22.
- (23) Bevan S, Popat S, Braegger CP, Busch A, O'Donoghue D, Falth-Magnusson K, et al. Contribution of the MHC region to the familial risk of coeliac disease. *J Med Genet* 1999 Sep;36(9):687-90.
- (24) Petronzelli F, Bonamico M, Ferrante P, Grillo R, Mora B, Mariani P, et al. Genetic contribution of the HLA region to the familial clustering of coeliac disease. *Ann Hum Genet* 1997 Jul;61 (Pt 4):307-17.
- (25) Furuya T, Salstrom JL, Call-Vining S, Cannon GW, Joe B, Remmers EF, et al. Genetic dissection of a rat model for rheumatoid arthritis: significant gender influences on autosomal modifier loci. *Hum Mol Genet* 2000 Sep 22;9(15):2241-50.
- (26) Holopainen P, Mustalahti K, Uimari P, Collin P, Maki M, Partanen J. Candidate gene regions and genetic heterogeneity in gluten sensitivity. *Gut* 2001 May;48(5):696-701.
- (27) Schuppan D. Current concepts of celiac disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2000 Jul;119(1):234-42.
- (28) Daum S, Bauer U, Foss HD, Schuppan D, Stein H, Riecken EO, et al. Increased expression of mRNA for matrix metalloproteinases-1 and -3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in intestinal biopsy specimens from patients with coeliac disease. *Gut* 1999 Jan;44(1):17-25.
- (29) Louka AS, Stensby EK, Ek J, Gudjonsdottir AH, Ascher H, Sollid LM. Coeliac disease candidate genes: no association with functional polymorphisms in matrix metalloproteinase 1 and 3 gene promoters. *Scand J Gastroenterol* 2002 Aug;37(8):931-5.
- (30) Rutter JL, Mitchell TI, Buttice G, Meyers J, Gusella JF, Ozelius LJ, et al. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription. *Cancer Res* 1998 Dec 1;58(23):5321-5.

- (31) Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet* 1993 Mar;52(3):506-16.
- (32) Louka AS. Automated DNA Sequencing, Optimisation of Automated Sequencing for a Perkin Elmer ABI Prism 377XL DNA Sequencer. 26-9-1998.
- (33) Veilleux C. PCR Technology. www.accessexcellence.org.
- (34) Principle of the PCR. 8-11-1999. allserv.rug.ac.be.
- (35) Powledge TM. The polymerase chain reaction. *Adv Physiol Educ* 2004 Dec;28(1-4):44-50.
- (36) ABI 377 & ABI 3700 DNA Sequencer. www.gmi-inc.com, GMI.
- (37) Dudbridge F. TDTPHASE programme. <ftp://ftp.hgmp.mrc.ac.uk/pub/linkage>.
- (38) StatsDirect: Statistical Software. McNemar chi-square and exact test for matched pairs. 2005. http://www.statsdirect.com/help/chi_square_tests/mat.htm, StatsDirect Ltd.